

BE



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/96, G01N 33/532, 33/58, 33/577</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/00284</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Januar 1996 (04.01.96)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02446</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juni 1995 (23.06.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: left;">P 44 21 907.5 195 11 940.1</div> <div style="text-align: left;">24. Juni 1994 (24.06.94) 31. März 1995 (31.03.95)</div> <div style="text-align: left;">DE DE</div> </div> </p></td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, KR, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </td> </tr> </table> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Postfach 11 40, D-35001 Marburg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NEUENHOFER, Stephan [DE/DE]; Rotenberg 19, D-35037 Marburg (DE). KÄSMARKER, Reinhard [AT/DE]; Badener Strasse 6, D-65824 Schwalbach/Ts. (DE). WALTER, Götz [DE/DE]; Schlosserstrasse 3, D-35274 Großseelheim (DE). HARTHUS, Hans-Peter [DE/DE]; Auf der Jöck 8, D-35041 Marburg-Wehrda (DE). NAU, Günther [DE/DE]; Kolpingstrasse 4, D-35043 Marburg-Schröck (DE). SKRZIPCZYK, Heinz-Jürgen [DE/DE]; Fortsthaus Weg 11, D-63263 Neu-Isenburg (DE). MOLZ, Peter [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Ring 44, D-55118 Mainz (DE). MADRY, Norbert [DE/DE]; Höhenweg 68, D-35041 Marburg (DE).</p>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02446</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juni 1995 (23.06.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: left;">P 44 21 907.5 195 11 940.1</div> <div style="text-align: left;">24. Juni 1994 (24.06.94) 31. März 1995 (31.03.95)</div> <div style="text-align: left;">DE DE</div> </div> </p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, KR, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02446</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juni 1995 (23.06.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: left;">P 44 21 907.5 195 11 940.1</div> <div style="text-align: left;">24. Juni 1994 (24.06.94) 31. März 1995 (31.03.95)</div> <div style="text-align: left;">DE DE</div> </div> </p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, KR, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			
<p>(54) Title: METHOD OF STABILIZING MOLECULES, OR PARTS OF MOLECULES, WHICH ARE SENSITIVE TO HYDROLYSIS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR STABILISIERUNG VON HYDROLYSEEMPFLINDLICHEN MOLEKÜLEN ODER MOLEKÜLTEILEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a method of stabilizing molecules, or parts of molecules, which are sensitive to hydrolysis, in particular hydrolysis-sensitive labels or label-containing tracers in aqueous solutions. The invention also concerns kits for carrying out immunological assays making use of the method proposed.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Molekülen oder Molekülteilen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Labeln bzw. Label-haltigen Tracern in wässrigen Lösungen. Ferner betrifft die Erfindung Kits zur Durchführung von immunologischen Nachweisverfahren unter Einsatz der genannten Verfahren.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Molekülen oder Molekülteilen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Molekülen oder Molekülteilen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Labeln bzw. Label-haltigen Tracern in wäßrigen Lösungen.

Immunologische Nachweisverfahren haben in der in vitro Diagnostik eine hohe Bedeutung erlangt. Ursache dafür ist, daß sie hochspezifisch und äußerst empfindlich sind. Zudem zeichnen sich diese Verfahren durch eine einfache Handhabung aus. Die Nachweisverfahren beruhen auf der immunologischen Wechselwirkung zwischen dem nachzuweisenden Analyten und seinem Bindungspartner bzw. seinen Bindungspartnern.

Im Falle der "Sandwich-Assays" wird der Analyt von zwei verschiedenen Antikörpern sandwichartig gebunden. Einer der beiden Antikörper trägt eine Markierung, wodurch seine Konzentration und damit die des Sandwichkomplexes bestimmt werden kann. Im Falle kleiner Analyte scheidet das Sandwich-Verfahren aus, da aus sterischen Gründen nicht gleichzeitig zwei verschiedene Antikörper am Analyten binden können. Hier finden in der Regel die kompetitiven Assays Anwendung. Dabei konkurrieren der Analyt und ein synthetisches Derivat des Analyten um die Bindungsstellen des Antikörpers. Markiert wird in der Regel entweder das Analytderivat (klassisch kompetitives Verfahren) oder der Antikörper.

Gebräuchliche Markierungen sind z.B. radioaktive Isotope oder lumineszierende (fluoreszierende, phosphoreszierende, chemilumineszierende, biolumineszierende usw.) oder zur Absorption befähigte Substanzen. Das markierte Reagens (Antikörper, Analytderivat) wird im folgenden als Tracer bezeichnet.

Die Aufbewahrung des Tracers erfolgt häufig in einer für den Anwender gebrauchsfertigen wäßrigen Lösung. Da es sich in vielen Fällen bei den Labeln

- 2 -

um nicht hydrolyseresistente Substanzen handelt, bedeutet die Aufbewahrung in wäßriger Lösung in der Regel eine ungewollte Begrenzung der Haltbarkeit. Diese äußert sich vor allem in einer mit zunehmender Lagerzeit abnehmenden Signalthöhe bei der Messung. Als Konsequenz wird häufig die Haltbarkeitsdauer des gesamten Kits verringert.

Der vorliegenden Erfindung lag somit das technische Problem zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, das die Hydrolyseempfindlichkeit von Molekülen, Molekülteilen und insbesondere als Label in immunologischen Nachweisverfahren verwendeten Substanzen herabsetzt.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die Bereitstellung der in den Patentanprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen. Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß der Zusatz von gegen die zu stabilisierenden Moleküle, Molekülteile oder Label gerichteten Antikörpern die Hydrolyseempfindlichkeit der genannten Substanzen beträchtlich herabsetzt. Die Schutzwirkung vor der Hydrolyse beruht vermutlich darauf, daß der Angriff hydrophiler Teilchen (H_2O , OH^- , H_3O^+) aus sterischen Gründen und/oder durch Schaffung einer hydrophoben Umgebung erschwert wird. Eine derartige Schutzwirkung vor Hydrolyse erstreckt sich also grundsätzlich auf sämtliche hydrolyseempfindlichen Moleküle, Molekülteile oder Label, vorausgesetzt, daß gegen diese Substanzen Antikörper erzeugt werden können, um das erfindungsgemäße Verfahren ausführen zu können.

Somit betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Molekülen oder Molekülteilen in wäßriger Lösung, das dadurch gekennzeichnet ist, daß der wäßrigen Molekül- oder Molekülteillösung gegen die Moleküle oder Molekülteile gerichtete Antikörper zugesetzt werden. Unter dem Begriff "Stabilisierung" ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Verhinderung oder Verlangsamung der Hydrolyse eines Moleküls, Molekülteils oder Labels zu verstehen. Unter dem Begriff "Molekül" ist ein durch chemische Bindungen zusammengehaltenes Teilchen zu verstehen, das zwei oder mehrere gleichartige oder ungleichartige Atome umfaßt. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung fallen auch Ionen oder Radikale der Moleküle unter diese Bezeichnung. Unter dem Begriff "Molekülteil" sind Teile dieses Moleküls zu verstehen, die durch Abspaltung von dem gesamten Molekül entstehen können. Der Begriff "hydrolyseempfindlich" bezeichnet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Fähigkeit einer Verbindung, hier eines

- 3 -

Moleküls, Molekülteils, eines Labels oder Tracers, eine chemische Reaktion unter Beteiligung von H_2O und/oder H_3O^+ und/oder OH^- einzugehen, die zu einem unerwünschten, d.h. einem nicht mehr signalfähigen oder eingeschränkt signalfähigen Produkt führt.

Unter dem Begriff "Antikörper" sind monoklonale oder polyklonale Antikörper zu verstehen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung fallen auch chimäre Antikörper, bispezifische Antikörper, Antikörperfragmente (z.B. $(Fab')_2$, Fab, Fv) (semi)synthetische und chemisch modifizierte Antikörper oder Antikörperfragmente unter diesen Begriff.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine beträchtliche Erhöhung der Stabilität in wässriger Lösung von hydrolyseempfindlichen Molekülen oder Molekülteilen, gegen die Antikörper gerichtet werden können.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Stabilisierung von in immunologischen Nachweisverfahren verwendeten Labeln. Unter dem Begriff "Label" wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Markierung, ein Marker bzw. ein Signalgeber in Molekülform verstanden. Dieses Label kann eine zur Lumineszenz, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Chemilumineszenz, Biolumineszenz oder Elektrolumineszenz befähigte Gruppe sein. Insbesondere ist ein Label ein Acridiniumester, ein Acridiniumacylsulfonamid, ein Luminol oder dessen Derivate, ein Isoluminol oder dessen Derivate, ein Dioxetan, ein Luciferin, ein Oxalsäureester oder ein Oxalsäureamid. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht so eine beträchtliche Erhöhung der Stabilität mit einem Label markierter Tracer, die beispielsweise in Nachweisverfahren insbesondere in immunologischen Nachweisverfahren Verwendung finden können.

Die Erfindung betrifft außerdem einen Kit enthaltend ein hydrolyseempfindliches Molekül oder einen hydrolyseempfindlichen Molekülteil und einen dagegen gerichteten stabilisierenden Antikörper. Insbesondere betrifft die Erfindung einen Kit, wobei der zu stabilisierende Molekülteil ein Label bzw. das zu stabilisierende Molekül ein Tracer ist. Der erfindungsgemäße Kit kann vorzugsweise in einem immunologischen Nachweisverfahren verwendet werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Kit zum Ausführen eines kompetitiven immunologischen Nachweisverfahrens, umfassend ein Analytderivat und einen Antikörper, wobei entweder das Analytderivat oder der Antikörper mit einem Label markiert ist und einen gegen das Label ge-

- 4 -

richteten Antikörper. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Kit zur Durchführung eines Sandwichtests, umfassend zwei gegen den Analyten gerichteten Antikörper, die unterschiedliche Epitope des Analyten binden und wobei einer der Antikörper mit einem Label markiert ist sowie einen gegen das Label gerichteten Antikörper.

Die gegen den Analyten gerichteten Antikörper können polyklonalen, monoklonalen, chimären, synthetischen oder semisynthetischen Ursprungs sein. Schließlich betrifft die Erfindung einen wie vorstehend definierten Kit, wobei der gegen das Molekül, das Molekülteil oder das Label gerichtete Antikörper, ein monoklonaler Antikörper, ein polyklonaler Antikörper, ein chimärer Antikörper ein, synthetischer oder semisynthetischer, ein Antikörperfragment, ein chemisch modifizierter Antikörper oder ein chemisch modifiziertes Antikörperfragment ist.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Stabilisierung eines Anti-PSA-Tracers

Schritt 1: Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein luminogenes Acridiniumacylsulfonamid-Label

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper wurden BALB/c-Mäuse subcutan oder intraperitoneal mit 10 µg Acridiniumacylsulfonamid-BSA injiziert, das in komplettem Freund's Adjuvans emulgiert war. Es folgten 4 bis 5 zusätzliche Immunisierungen ohne Adjuvans (im Abstand von jeweils vier Wochen). Die letzten vier Tage vor der Fusion wurden die Mäuse intravenös nachimmunisiert (10 µg pro Tag).

Zur Herstellung von Hybridomen wurden die immunisierten Tiere mittels cervikaler Luxation getötet. Die Milz wurde aseptisch entfernt und auseinandergezupft, um eine Einzelzellsuspension von Milzzellen in serumfreiem, nach Dulbecco modifiziertem Eagle Medium (DMEM) zu erhalten. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (5 Min.; 1800 UpM.) gesammelt und einmal in DMEM gewaschen. Die Gesamtzellanzahl wurde durch Hämocytometer-Zählung unter Verwendung der Trypanblau-Exklusionstechnik bestimmt. Die als Fusionspartner verwendeten Maus-Myelomzellen (Sp2/O) wurden zweimal in serumfreiem DMEM gewaschen, mittels Zentrifugation gesammelt (10 Min., 1000 UpM.) und gezählt wie vorstehend für die Milzzellen beschrieben.

Etwa 10^8 Milzzellen wurden mit 2×10^7 Sp2/O Maus-Myelomzellen gemischt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 UpM. wurde der Überstand entfernt und 1 ml Polyethylenglycol (PEG 4000, Firma Merck, 50 %) in das Gefäß mit dem Pellet gegeben. Das Pellet wurde dann unter leichtem Klopfen resuspendiert und 1 Minute bei 37 °C inkubiert. 10 ml serumfreies DMEM wurden tropfenweise unter leichtem Klopfen zugegeben und das Gemisch 2 bis 4 Minuten inkubiert. Die fusionierten Zellen wurden anschließend 10 Minuten bei 1000 UpM. zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 20 % fötalem Kälberserum (FCS) und HAT (Hypoxanthin 0,1 mM; Aminopterin 0,4 µM; Thymidin 16 µM) enthaltendem DMEM suspendiert und auf Kulturplatten (Nunc) mit 24 Vertiefungen mit einer näherungsweisen Konzentration von 5×10^4 - 10^6 Zellen pro Vertiefung ausplattiert. Nach 2 bis 3 Wochen wurden einzelne Zellkolonien aus den einzelnen Vertiefungen entnommen und in Vertiefungen einer neuen Kul-

turplatte kultiviert.

Die Kulturüberstände wurden auf antigenspezifische Antikörper mittels der EIA-Technik abgesucht. Jede mit Acridinium-BSA (3 µg/ml) beschichtete Vertiefung einer Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl des Überstandes gefüllt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wurden 100 µl eines Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper-POD-Konjugats für eine zusätzliche Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation mit dem Substrat wurde die Farbentwicklung bei 492 nm auf einem Behring-ELISA-Prozessor (BEP) abgelesen. Hybridome, die Antikörper mit einer geeigneten Antigen-spezifität herstellen, wurden ausgewählt und unter Verwendung eines Einzelzellmanipulators kloniert. Zur Herstellung großer Mengen monoklonaler Antikörper wurden die Klone in Massenkultur vermehrt. Die anschließende Reinigung der einzelnen monoklonalen Antikörper wurde mittels Protein A-Chromatographie durchgeführt.

Schritt 2: Herstellung eines Anti-PSA-Tracers

0,1 mg eines Anti-PSA-MAK (monoklonaler Antikörper, der gegen das Prostata-spezifische Antigen (PSA) gerichtet ist; beispielsweise BW 92-284/03, Behringwerke AG) wurden in 0,7 ml 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH 8,0) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 30 µl einer Markierungslösung (0,1 mg Acridinium-macysulfonamid (mit N-Succinimidyl-Reaktivgruppe) pro ml Acetonitril) gegeben und die Reaktionslösung 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,3 ml einer wässrigen Lysin-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Der Tracer wurde gelchromatographisch (Sephadex G 25) gereinigt.

Der gereinigte Tracer wurde schließlich in einer Konzentration von 600 ng/ml in einem 0,05 M Tris/HCl Puffer (pH 7,4; 2 g Rinderserumalbumin, 8,8 g NaCl und 0,5 g Natriumazid pro Liter) gelöst.

Schritt 3: Stabilisierung der Tracer-Lösung

Tracer-Lösung A: Zur Stabilisierung wurden der Tracer-Lösung (Schritt 2) anti-Label-Antikörper (BW 90-9/016, erhalten in Schritt 1, DSM ACC 2183) in einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt.

- 7 -

Tracer-Lösung B: Bei der Vergleichslösung wurde kein anti-Label-Antikörper zugesetzt.

Ergebnis

Nach fünfwöchiger Lagerung der Tracer-Lösung A und B bei 37 °C blieb die Anfangssignalaktivität im Falle von Tracer-Lösung A praktisch unverändert und sank im Falle von Tracer-Lösung B um 87 % (Figur 1).

Beispiel 2

Stabilisierung eines anti-T3-Tracers

Schritt 1: Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein luminogenes Acridiniumacylsulfonamid-Label (EP-A-0 257 541 und EP-A-0 330 050)

Der monoklonale Antikörper wurde nach dem in Schritt 1 des Beispiels 1 erläuterten Verfahren hergestellt.

Schritt 2: Herstellung eines anti-T3-Tracers

0,1 mg anti-T3-MAK, ein gegen das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin (T3) gerichteter monoklonaler Antikörper (ImmunoGen International Ltd., Best. Nr. 13-3 D8-38, Gateshead, UK), wurde in 0,7 ml 0,1 molaren Phosphatpuffer (pH 8,0) gelöst. Zu dieser Lösung wurde 5 µl einer Markierungslösung (1,0 mg Acridiniumacylsulfonamid (mit N-Succinimidyl-Reaktivgruppe) pro ml Acetonitril) pipettiert und die Reaktionslösung 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,3 ml einer wässrigen Lysin-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Der Tracer wurde gelchromatographisch (Sephadex G 25) gereinigt.

Schritt 3: Herstellung der Tracer-Lösung

Der gereinigte Tracer (Schritt 2) wurde in einer Konzentration von 90 ng/ml in einem 0,05 M Tris/HCl-Puffer (pH 7,4; 2 g Rinderserumalbumin, 8,8 g NaCl, 0,25 g ANS (8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure) und 0,5 g Natriumazid pro Liter) gelöst.

Schritt 4: Stabilisierung der Tracer-Lösung

Tracer-Lösung A: Zur Stabilisierung wurden der Tracer-Lösung (Schritt 3) anti-Label-Antikörper (BW 90-9/016, DSM ACC 2183, Schritt 1) in einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt.

Tracer-Lösung B: Bei der Vergleichslösung wurde kein anti-Label-Antikörper zugesetzt.

Ergebnis

Figur 2 zeigt Standardkurven, die mit den beiden Tracern nach vierwöchiger Lagerung bei 37 °C erhalten wurden. Die Signalthöhe liegt im Falle der Tracer-Lösung A deutlich über der von Tracer-Lösung B.

Beispiel 3

Stabilisierung eines T3-Tracers

Schritt 1: Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein luminogenes Acridiniumsulfonamid-Label (EP-A-O 257 541 und EP-A-O 330 050) :

Der monoklonale Antikörper wurde nach dem in Schritt 1 des Beispiels 1 erläuterten Verfahren hergestellt.

Schritt 2: Herstellung eines T3-Tracers

40 mg Kaninchen-IgG wurden in 8 ml PBS-Puffer, pH 7,2, gelöst. Es wurden 8 ml 0,2 M LiBO₃-Lösung (Wasser mit 20 % Dioxan) und 0,22 ml GMBS-Lösung (10 mg gamma-Maleinimidobutansäure-N-succinimidylester/ml Dioxan) zugesetzt. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde über eine Biogel P2-Säule entsalzt. Das resultierende Eluat ("Lösung 1") hatte ein Volumen von etwa 20 ml.

6,9 mg Triiodthyronin (T3) wurden in 0,69 ml DMSO gelöst. Es wurden 10 µl N-Ethylmorpholin und 2,1 mg SAMSA (S-Acetylmercaptobornsteinsäureanhydrid), gelöst in 0,1 ml DMSO, zugegeben. Nach 30 Minuten wurden 0,1 ml 1 M wäßrige Hydroxylamin-Lösung zupipettiert. Die Lösung ("Lösung 2") wird 15 Minu-

- 9 -

ten bei Raumtemperatur inkubiert. Lösung 1 und Lösung 2 wurden gemischt und 3 ml DMSO zugegeben. Nach 2 Stunden wurde mittels Biogel P6 entsalzt und das Konjugat lyophilisiert.

0,1 mg des IgG-T3-Konjugats wurden in 0,7 ml 0,1 molaren Phosphatpuffer (pH 8,0) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 10 µl einer Markierungslösung (0,1 mg Acridiniumacetylsulfonamid (mit N-Succinimidyl-Reaktivgruppe) pro ml Acetonitril) pipettiert und die Reaktionslösung 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,3 ml einer wäßrigen Lysin-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Der Tracer wurde gelchromatographisch (Sephadex G 25) gereinigt:

Schritt 3: Herstellung der Tracer-Lösung

Der gereinigte Tracer (Schritt 2) wurde in einer Konzentration von 30 ng/ml in einem 0,05 M Tris/HCl Puffer (pH 7,4; 2g Rinderserumalbumin, 8,8 g NaCl, 0,25 g ANS und 0,5 g Natriumazid pro Liter) gelöst.

Schritt 4: Stabilisierung der Tracer-Lösung

Tracer-Lösung A: Zur Stabilisierung wurden der Tracer-Lösung (Schritt 3) anti-Label-Antikörper (BW 90-9/016, DSM AACC 2183, Schritt 1) in einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt.

Tracer-Lösung B: Bei der Vergleichslösung wurde kein anti-Label-Antikörper zugesetzt.

Ergebnis

Figur 3 zeigt Standardkurven, die mit den beiden Tracern nach 4-wöchiger Lagerung bei 37 °C erhalten wurden. Die Signalthöhe liegt im Falle der Tracer-Lösung A deutlich über der von Tracer-Lösung B.

Beispiel 4

Vergleich verschiedener anti-Label-Antikörper

Die untersuchten anti-Label-Antikörper zeigten zum Teil ein sehr unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer Fähigkeit, Tracer zu stabilisieren (Figur 4a) und

- 10 -

bezüglich der Kinetik der Lichtemission. Figur 4b zeigt die Lichtausbeute der verschiedenen anti-Label-Antikörper in Abhängigkeit von der Meßzeit.

Das nachfolgend aufgeführte Hybridom wurden bei der DSM in Braunschweig hinterlegt. Die Bezeichnung des von diesem Hybridom produzierten Antikörpers entspricht der des Hybridoms.

Hybridom	DSM-Hinterlegungsnummer	Datum der Hinterlegung
BW 90-342-9-016	2183	21.07.94

Die Figuren zeigen:

Figur 1: Signalstabilität des anti-PSA-Tracers nach Lagerung bei 37 °C; mit und ohne Zusatz von anti-Label-Antikörpern; RLU bedeutet relative Lichteinheiten.

Figur 2: T3-SPALT (solid phase antigen luminescence technique; Festphasen-antigen-Lumineszenzverfahren)-Assays, Durchführung mit 4 Wochen bei 37 °C gelagerten Tracern. Der SPALT-Assay ist ein kompetitiver Lumineszenzimmuntest, bei dem ein markiertes Analytderivat (=Analyttracer) mit dem zu bestimmenden Analyten um die Bindungsstellen eines markierten Antikörpers (Antikörpertracers) konkurriert.

Figur 3: T3-LIAs (Lumineszenzimmuntest), Durchführung mit 4 Wochen bei 37 °C gelagerten Tracern. Der LIA ist ein kompetitiver Lumineszenzimmuntest, bei dem ein markiertes Analytderivat (=Analyttracer) mit dem zu bestimmenden Analyten um die Bindungsstellen eines (hier festphasengebundenen) Antikörpers konkurriert.

Figur 4a: Unterschiedliche Stabilisierungswirkung verschiedener anti-Label-Antikörper.

Figur 4b: Lichtausbeuten eines anti-PSA-Tracers in Abhängigkeit vom zugesetzten monoklonalen anti-Label Antikörper.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Molekülen oder Molekülteilen in wäßriger Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß der wäßrigen Molekül- oder Molekülteillösung gegen die Moleküle oder Molekülteile gerichtete Antikörper zugesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das hydrolyseempfindliche Molekül oder der hydrolyseempfindliche Molekülteil ein in immunologischen Nachweisverfahren verwendetes Label ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Label eine zur Lumineszenz, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Chemilumineszenz, Biolumineszenz, Absorption oder Elektrolumineszenz befähigte Gruppe ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Label ein Acridiniumester, ein Acridiniumacylsulfonamid, ein Luminol, ein Isoluminol oder deren Derivate, ein Dioxetan, ein Luciferin, ein Oxalsäureester oder ein Oxalsäureamid ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der gegen das Molekül, das Molekülteil oder das Label gerichtete Antikörper ein monoklonaler Antikörper, ein polyklonaler Antikörper, ein chimärer Antikörper, ein (semi)synthetischer Antikörper, ein Antikörperfragment oder ein chemisch modifizierter Antikörper oder ein chemisch modifiziertes Antikörperfragment ist.
6. Kit enthaltend ein hydrolyseempfindliches Molekül oder einen hydrolyseempfindlichen Molekülteil und einen dagegen gerichteten stabilisierenden Antikörper.
7. Kit nach Anspruch 6, wobei das zu stabilisierende Molekülteil ein Label ist.
8. Kit nach Anspruch 7, wobei der Kit zur Verwendung in einem immunologischen Nachweisverfahren dient.

- 12 -

9. Kit nach Anspruch 8, wobei das immunologische Nachweisverfahren ein kompetitives immunologisches Nachweisverfahren ist, umfassend ein Analytderivat und einen Antikörper, wobei entweder das Analytderivat oder der Antikörper mit einem Label markiert ist, und einen gegen das Label gerichteten Antikörper.
10. Kit nach Anspruch 8, wobei das immunologische Nachweisverfahren ein Sandwichtest ist, umfassend zwei gegen den Analyten gerichtete Antikörper, die unterschiedliche Epitope des Analyten binden und einer der Antikörper mit einem Label markiert ist, und einen gegen das Label gerichteten Antikörper.
11. Kit nach einem der Ansprüche 6 bis 10, wobei der gegen das Molekül, den Molekülteil oder das Label gerichtete Antikörper ein monoklonaler Antikörper, ein polyklonaler Antikörper, ein chimärer Antikörper, ein (semi)synthetischer Antikörper, ein Antikörperfragment oder ein chemisch modifizierter Antikörper oder ein chemisch modifiziertes Antikörperfragment ist.

Fig. 1

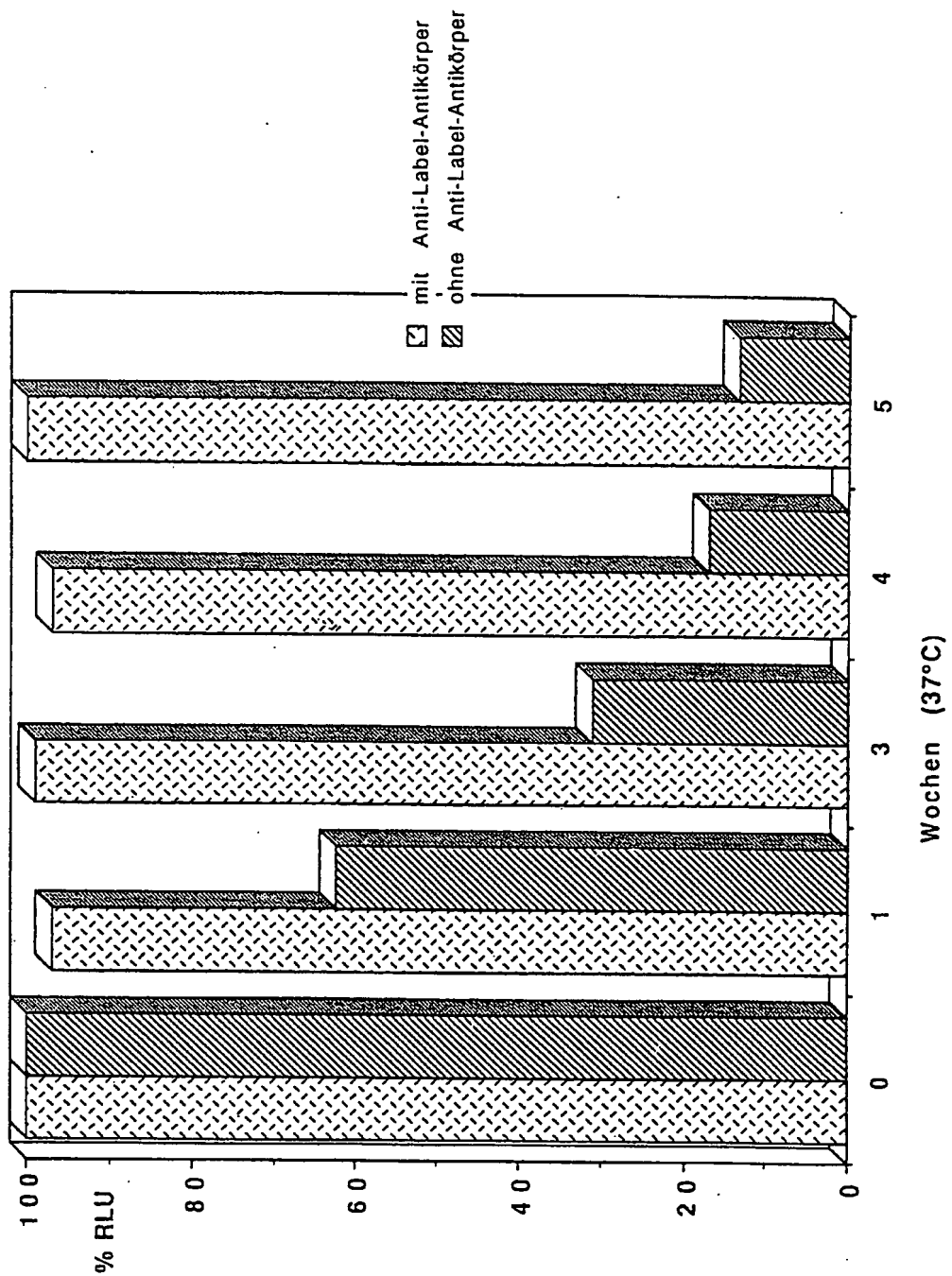


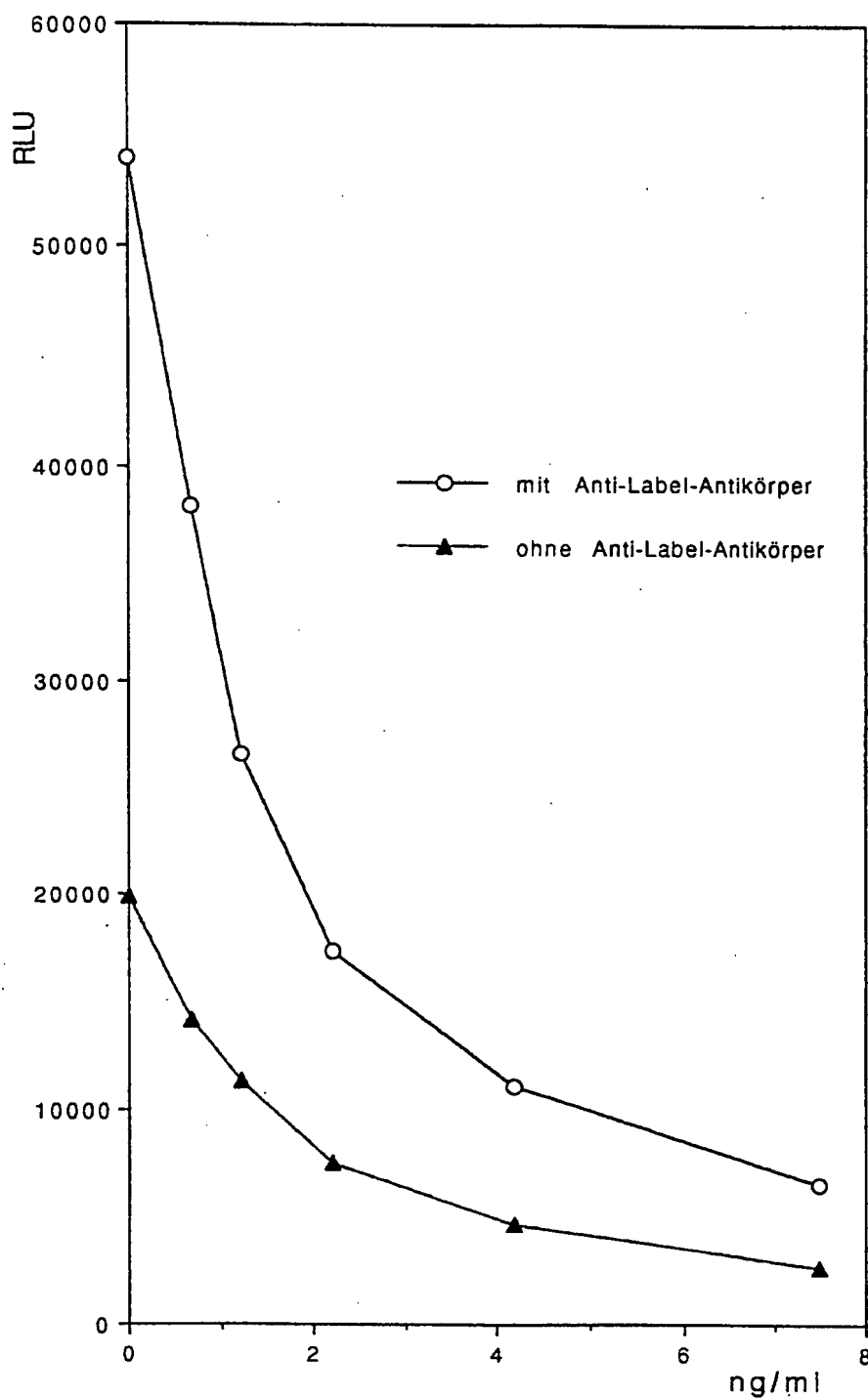
Fig. 2

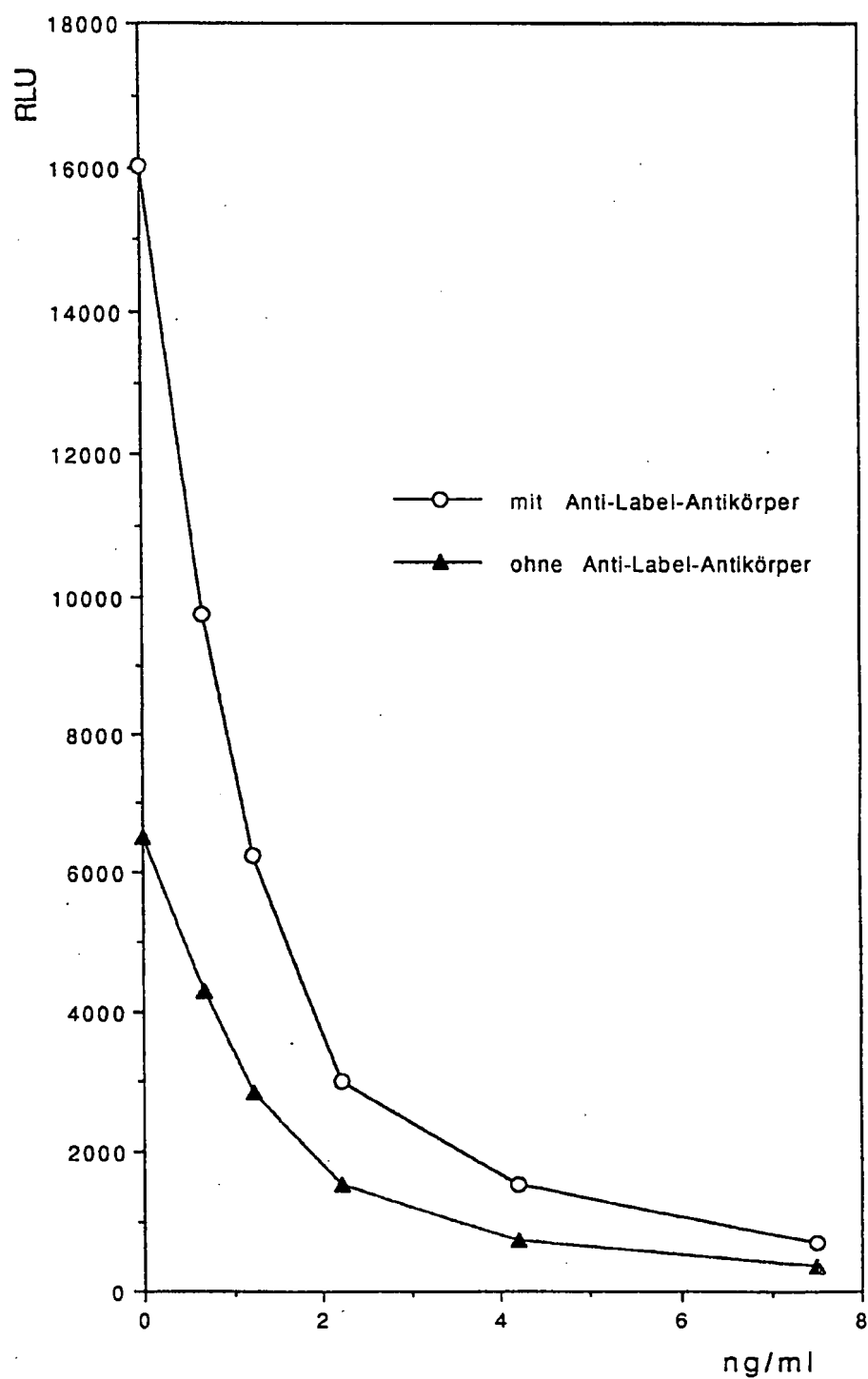
Fig. 3

Fig. 4a

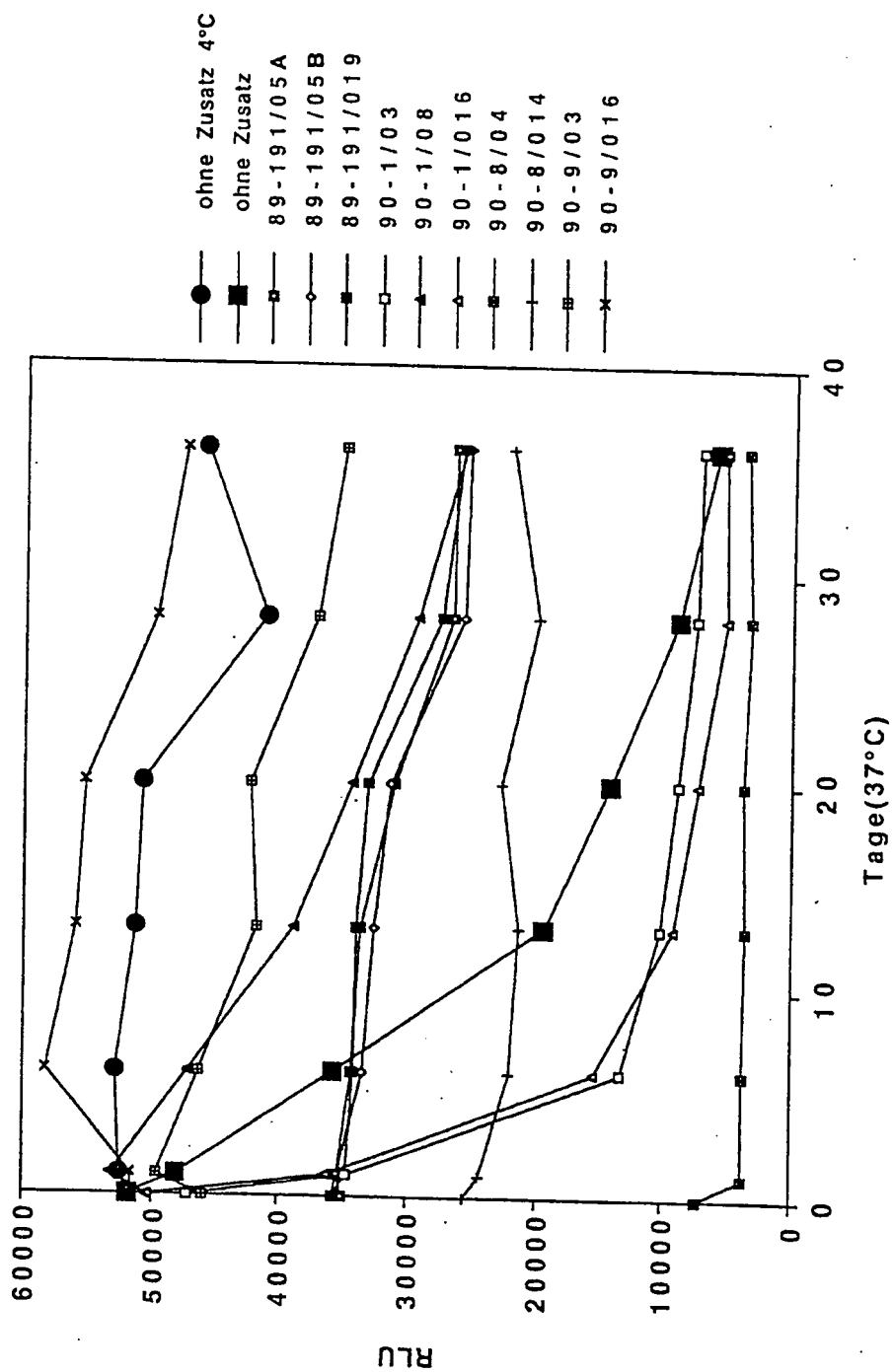
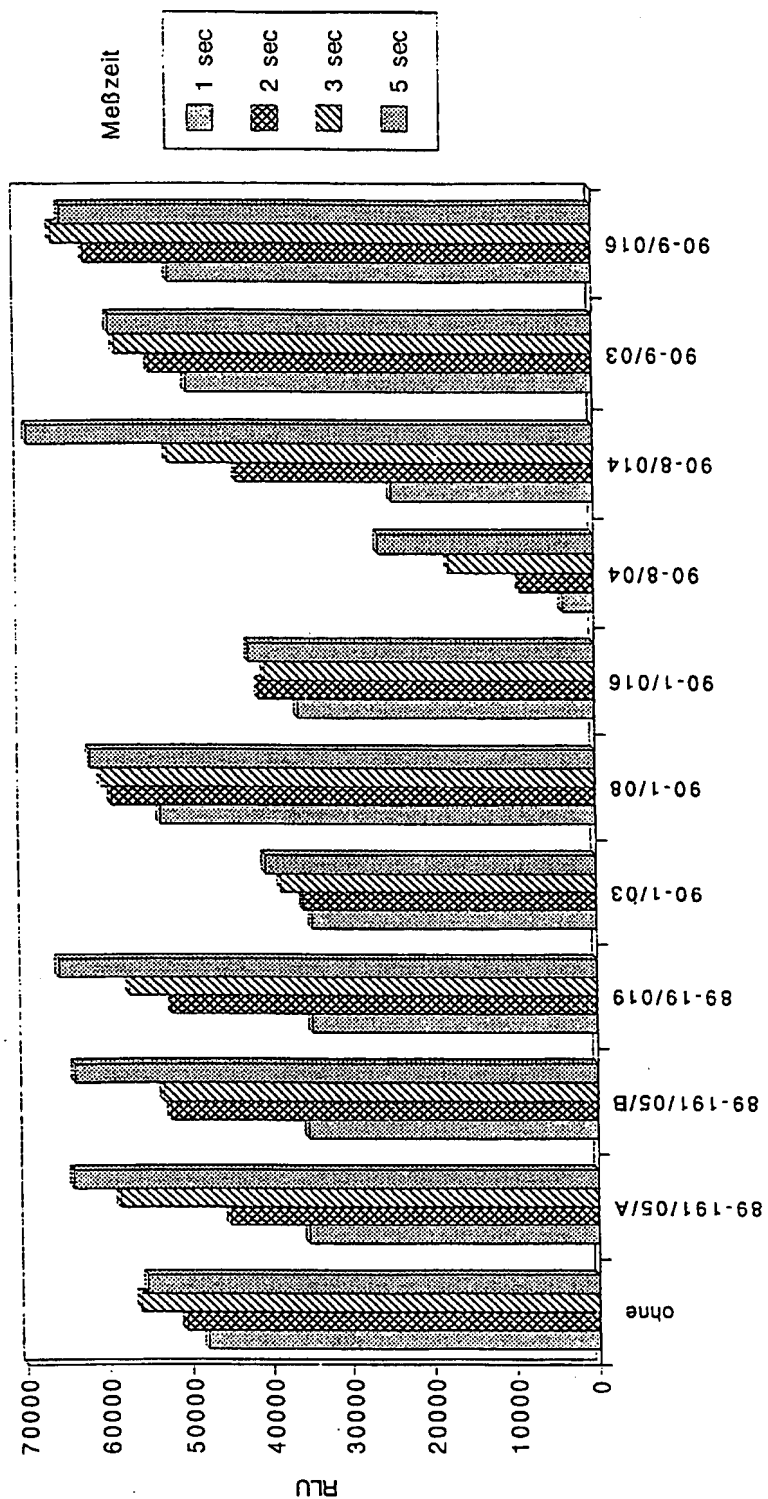


Fig. 4b



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/02446

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N9/96 G01N33/532 G01N33/58 G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 487 301 (SYNTEX (U.S.A.) INC.) 27 May 1992	1,2,5-11
Y	see the whole document ---	3,4
Y	WO,A,93 20074 (ABBOTT LABORATORIES) 14 October 1993 see the whole document ---	3,4
Y	US,A,5 302 533 (L. J. KRICKA) 12 April 1994 see the whole document ---	3,4
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 1995

Date of mailing of the international search report

30. 10. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: 1 Application No

PCT/EP 95/02446

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 91, no. 9, 27 August 1979 Columbus, Ohio, US; abstract no. 71265, R. D. NARGESSI ET AL. 'Use of antibodies against the label in non-separation non-isotopic immunoassay: 'indirect quenching' fluoroimmunoassay of proteins.' page 305; column 1; see abstract & J. IMMUNOL. METHODS, vol. 26, no. 4, 1979 pages 307-313, -----</p>	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No

PCT/EP 95/02446

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-487301	27-05-92	CA-A- 2055812 JP-A- 4335888	21-05-92 24-11-92
WO-A-9320074	14-10-93	AU-B- 3936393	08-11-93
US-A-5302533	12-04-94	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internu ales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02446

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N9/96 G01N33/532 G01N33/58 G01N33/577

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikabonssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 487 301 (SYNTEX (U.S.A.) INC.) 27.Mai 1992	1,2,5-11
Y	siehe das ganze Dokument ---	3,4
Y	WO,A,93 20074 (ABBOTT LABORATORIES) 14.Oktober 1993 siehe das ganze Dokument ---	3,4
Y	US,A,5 302 533 (L. J. KRICKA) 12.April 1994 siehe das ganze Dokument ---	3,4
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19.Oktober 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30.10.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Griffith, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02446

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 91, no. 9, 27. August 1979 Columbus, Ohio, US; abstract no. 71265, R. D. NARGESSI ET AL. 'Use of antibodies against the label in non-separation non-isotopic immunoassay: 'indirect quenching' fluoroimmunoassay of proteins.' Seite 305; Spalte 1; siehe Zusammenfassung & J. IMMUNOL. METHODS, Bd. 26, Nr. 4, 1979 Seiten 307-313,</p> <p style="text-align: center;">----- .</p>	3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02446

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-487301	27-05-92	CA-A- 2055812 JP-A- 4335888	21-05-92 24-11-92
WO-A-9320074	14-10-93	AU-B- 3936393	08-11-93
US-A-5302533	12-04-94	KEINE	

BE



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/96, G01N 33/532, 33/58, 33/577		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/00284
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Januar 1996 (04.01.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02446		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, KR, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juni 1995 (23.06.95)			
(30) Prioritätsdaten: P 44 21 907.5 24. Juni 1994 (24.06.94) DE 195 11 940.1 31. März 1995 (31.03.95) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); Postfach 11 40, D-35001 Marburg (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NEUENHOFER, Stephan [DE/DE]; Rotenberg 19, D-35037 Marburg (DE). KÄSMARKER, Reinhard [AT/DE]; Badener Strasse 6, D-65824 Schwalbach/Ts. (DE). WALTER, Götz [DE/DE]; Schlosserstrasse 3, D-35274 Großseelheim (DE). HARTHUS, Hans-Peter [DE/DE]; Auf der Jöch 8, D-35041 Marburg-Wehrda (DE). NAU, Günther [DE/DE]; Kolpingstrasse 4, D-35043 Marburg-Schröck (DE). SKRZIPCZYK, Heinz-Jürgen [DE/DE]; Fortsthaus Weg 11, D-63263 Neu-Isenburg (DE). MOLZ, Peter [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Ring 44, D-55118 Mainz (DE). MADRY, Norbert [DE/DE]; Höhenweg 68, D-35041 Marburg (DE).			
(54) Title: METHOD OF STABILIZING MOLECULES, OR PARTS OF MOLECULES, WHICH ARE SENSITIVE TO HYDROLYSIS			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR STABILISIERUNG VON HYDROLYSEEMPFLINDLICHEN MOLEKÜLEN ODER MOLEKÜLTEILEN			
(57) Abstract			
The invention concerns a method of stabilizing molecules, or parts of molecules, which are sensitive to hydrolysis, in particular hydrolysis-sensitive labels or label-containing tracers in aqueous solutions. The invention also concerns kits for carrying out immunological assays making use of the method proposed.			
(57) Zusammenfassung			
Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Molekülen oder Molekülteilen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Labeln bzw. Label-haltigen Tracern in wässrigen Lösungen. Ferner betrifft die Erfindung Kits zur Durchführung von immunologischen Nachweisverfahren unter Einsatz der genannten Verfahren.			